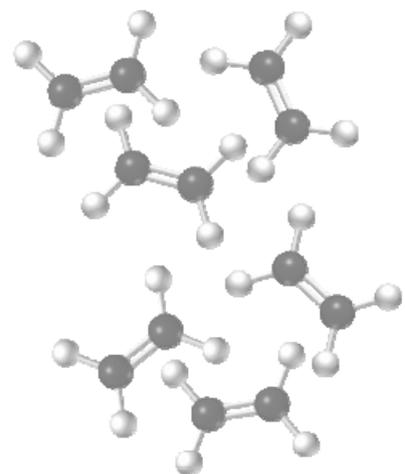


V - CAPÍTULO 2

HAHB4 modula la interrelación entre las vías de
señalización de etileno y sequía



V. - CAPITULO 2

HAHB4 modula la interrelación entre las vías de señalización de etileno y sequía.

V.1 – Introducción.

V.1.1 – El etileno.

El etileno, también llamado eteno, es un compuesto químico que se encuentra normalmente en forma gaseosa. La molécula de etileno está formada por dos átomos de carbono unidos mediante un doble enlace, y cuatro átomos de hidrogeno (Figura V.1). Este compuesto fue la primera molécula de estructura simple considerada como una hormona. Su descubrimiento en plantas se remonta a fines del siglo XIX. En ese entonces, el alumbrado público utilizaba lámparas de carbón y era frecuente observar que los árboles más cercanos a las lámparas perdían muchas más hojas que los que estaban alejados.

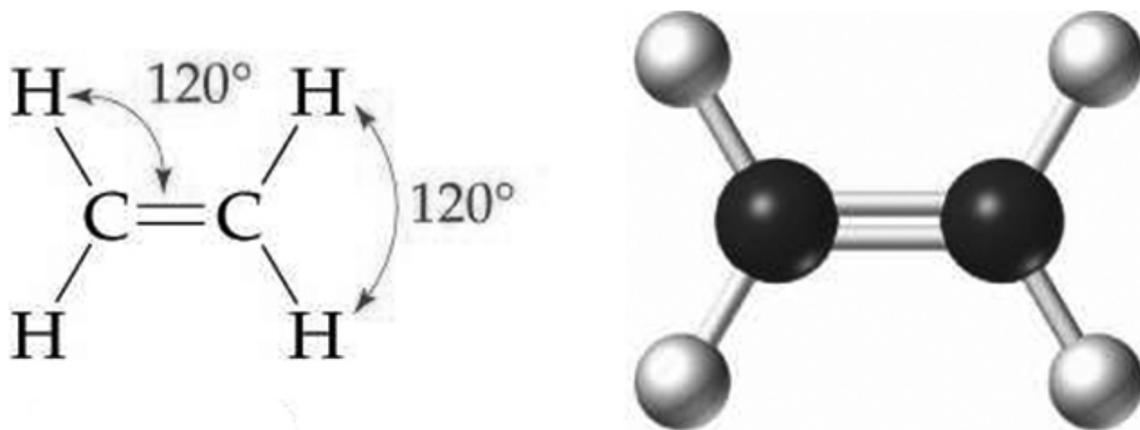


Figura V.1: Fórmula estructural y modelo espacial de la molécula de etileno. Las esferas blancas representan los átomos de hidrógeno y las negras los de carbono.

En el año 1901 el científico ruso Dimitri Neljubow descubrió que la combustión del carbón generaba un compuesto, el etileno, y éste causaba el fenómeno de la caída de las hojas. El descubrimiento fue realizado cuando este investigador observó que al hacer germinar semillas de arveja dentro de su laboratorio en total oscuridad, éstas presentaban un fenotipo particular caracterizado por la reducción de la longitud del hipocotilo, un incremento del crecimiento lateral con una exacerbación en la formación

del gancho apical y una reducción marcada del desarrollo de las raíces. Este fenómeno, que hoy se conoce como la triple respuesta al etileno, desaparecía si las semillas se hacían germinar en oscuridad pero al aire libre. Pasó algún tiempo hasta que el grupo de investigación del Dr. Neljubow identificara que el fenotipo observado se debía a la acumulación de etileno dentro del laboratorio, causada por la combustión del carbono de las lámparas usadas para la iluminación. La figura V.2 muestra las características morfológicas, típicas de la triple respuesta, causadas por bajas concentraciones de etileno en plántulas etioladas..

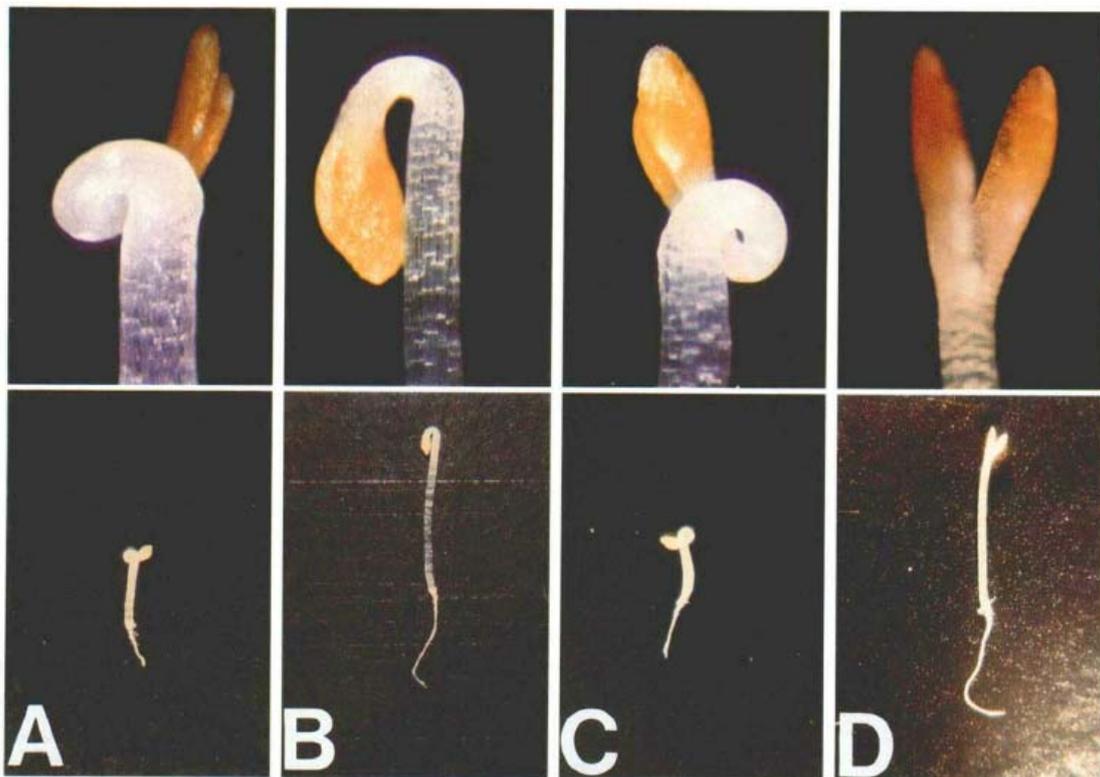


Figura V.2: Características morfológicas de plántulas de *Arabidopsis* salvajes y mutantes que presentan la triple respuesta al etileno. Cada panel está compuesto de dos fotos de la misma plántula, el superior muestra en detalle la región del gancho apical mientras que el inferior presenta una fotografía de la plántula completa. **A:** plántula salvaje etiolada en presencia de 10 μ l/l de etileno; **B:** plántula salvaje etiolada en ausencia de etileno; **C:** mutante *eto1* de respuesta constitutiva a etileno; **D:** mutante *ein2* (mutante insensible a la acción de la hormona). Figura extraída de Guzman y Ecker (1990).

En 1910 el Dr. H.H. Cousins informó que el etileno era producido endógenamente por las plantas. Cousins observó que la maduración de las bananas se aceleraba notoriamente cuando este proceso se producía en una cámara en la que previamente se habían hecho madurar naranjas. En estas cámaras persistía una alta

concentración de etileno a la que se le atribuyó el efecto, así como a las naranjas la producción del compuesto. El conocimiento alcanzado hoy en día indica que las naranjas producen concentraciones de etileno relativamente bajas, por lo que se presume que la maduración acelerada observada por el Dr. Cousins era principalmente debida a una infección de sus naranjas con el hongo *Penicillium*, frecuente patógeno de estas frutas y gran productor de etileno.

Recién en el año 1934, R. Gane fue capaz de identificar con certeza al etileno dentro de los metabolitos de una planta y por las características de sus efectos lo clasificó como una hormona. Hasta veinticinco años más tarde no se consideró al etileno como una hormona importante. El motivo de la desconsideración era que se pensaba que todos los efectos del etileno eran mediados por auxinas, las primeras fitohormonas identificadas. Recién después del advenimiento de la cromatografía gaseosa se reconoció definitivamente su importancia como hormona reguladora del crecimiento y desarrollo ya que esta técnica permitía su sencilla cuantificación. (Burg y Thimann, 1959; Burg y col., 1960).

V.1.2 – Biosíntesis y percepción del etileno.

La biosíntesis del etileno se produce en casi todos los tejidos de la planta si bien su tasa de producción varía entre los distintos órganos y estadios de desarrollo. En general las regiones meristemáticas son las mayores productoras y durante ciertos procesos como la abscisión de las hojas, la maduración de frutos y la senescencia, la producción de etileno aumenta notoriamente (Kende, 1993). Además, algunos estímulos externos como la sequía, el frío y las heridas, son capaces de inducir fuertemente su síntesis (Ecker y Davis, 1987; Ohme-Takagi y col., 2000; Alonso y Ecker, 2001).

A pesar de la simplicidad estructural de esta hormona, la identificación de sus vías de síntesis y percepción no se dilucidó en muchos años. Una metodología clave para dilucidar estas vías fue la identificación de plantas mutantes que presentaban alteraciones en la respuesta a etileno (Figura V.2 C y D entre otras).

V.1.2.1 – La síntesis.

En la figura V.3 se encuentra representada la vía de síntesis del etileno. En este proceso el único precursor es el amino ácido metionina. Dado que la metionina se encuentra en exceso en las células vegetales, y además es reciclada a través del ciclo de Yang, la falta de disponibilidad de este amino ácido no es un limitante para esta vía.

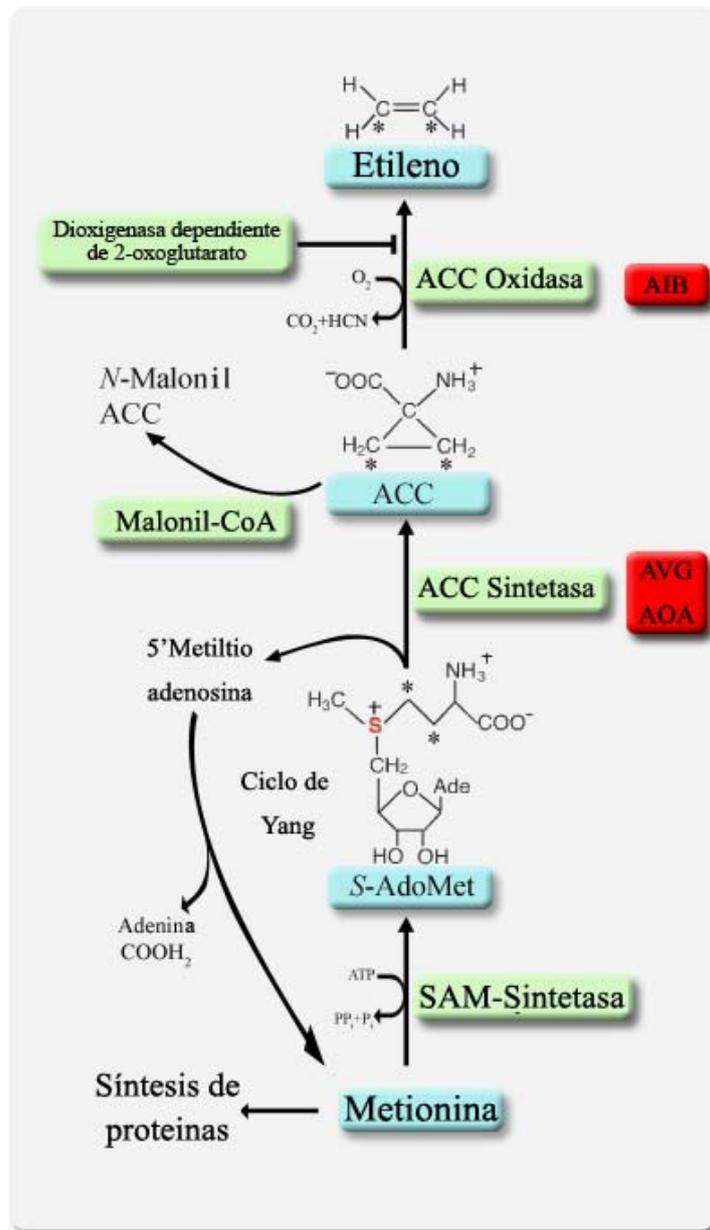


Figura V.3: Representación esquemática de la vía de síntesis de etileno. En los cuadros celestes están representados los compuestos intermediarios de la reacción catabólica. Los cuadros verdes representan las enzimas involucradas en cada paso. Los inhibidores conocidos de esta vía están señalados en rojo. AOA: ácido amino-oxicético; AVG aminoetoxivinilglicina; AIB: ácido α -aminoisobutirico; ACC: Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; S-AdoMet: S-adenosil-metionina; ATP: adenosina 5' trifosfato.

En el ciclo de Yang la metionina es convertida en S-AdoMet (S-adenosil-metionina) por la AdoMet-sintetasa. Este producto es transformado en ACC (Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) por la acción de la ACC- sintetasa. Esta última etapa es considerada el paso limitante de la vía ya que la enzima ACC-sintetasa tiene una vida

media extremadamente corta, es sumamente lábil y se encuentra en concentraciones muy bajas en la célula (Sato y Theologis, 1989; Rottmann y col., 1991). Los compuestos como el AOA (ácido amino-oxicético) y la AVG (aminoetoxivinilglicina) fueron descritos como inhibidores específicos de esta enzima y se utilizan comúnmente para reprimir la síntesis de etileno. (Yang y Hoffman, 1984).

Finalmente el ACC es transformado en etileno por la ACC-oxidasa. Raramente este paso se convierte en limitante de la vía ya que la ACC oxidasa es una enzima codificada por una familia multigénica y está siempre presente en la planta. Además es una enzima sumamente estable y su función puede ser ejercida al menos en parte, casi por cualquier otra oxidasa. Los niveles de esta enzima están regulados por el mismo etileno. Cuando estos niveles de la hormona son muy elevados, la planta reduce la síntesis de ACC-oxidasa y aumenta la producción de la enzima 2-ODD (2-oxoglucurato dependiente dioxigenasa), la cual inhibe la acción de la ACC oxidasa reduciendo de esta forma la acumulación de la hormona (Peñarrubia y col., 1992; Kneissl y Deikman, 1996). En los casos en los que estos procesos de regulación generan una acumulación excesiva de ACC, éste puede ser catabolizado por la malonil-CoA para generar *N*-Malonil ACC, que es fácilmente eliminado (Hoffman y col., 1982).

La conversión de ACC en etileno se puede inhibir con el agregado exógeno de un análogo estructural del ACC llamado AIB (ácido α -aminoisobutirico, Satoh y Esashi, 1980).

Una vez sintetizado, el etileno atraviesa fácilmente la membrana plasmática de la célula y se acumula en el compartimento extracelular. En la matriz extracelular es capaz de viajar hacia todos los tejidos de la planta para posteriormente ser liberado ya sea en su forma nativa o como CO₂.

La concentración de etileno en una planta puede ser aumentada artificialmente mediante el agregado de ACC exógeno o de Ethephon (Ácido 2-cloroetanofosfonico). Este último compuesto es absorbido por la planta y al ingresar en la célula se hidroliza en forma lenta y progresiva generando etileno (Riov y Yang, 1982). Es ampliamente utilizado en forma comercial para acelerar la maduración de frutas y verduras, especialmente en campos de tomates y manzanas.

Para una revisión completa de los procesos involucrados en la síntesis de etileno sugerimos leer los siguientes artículos: Lieberman, 1979; Peiser y col., 1984; Kende, 1993

V.1.2.2 – La percepción.

La mayoría de las moléculas que participan en las vías de percepción del etileno han sido identificadas analizando plantas mutantes que presentan respuestas atípicas al tratamiento con esta hormona. En la figura V.4 se muestra una representación gráfica de las vías de percepción y transducción de señales. La activación de los procesos mediados por etileno comienza cuando una molécula de esta hormona gaseosa se une a uno de sus receptores específicos ubicados en la membrana plasmática. Una vez unidos, el etileno le produce al receptor un cambio conformacional que resulta en la inactivación de una proteína de tipo MAP quinasa (llamada CTR1) unida al dominio intracelular de éste (Kieber y col., 1993). La inactivación de CTR1, y por consiguiente de la cascada de fosforilación que ella dispara, resulta en la activación de un receptor intracelular, llamado EIN2 (Alexander y Grierson, 2002). Este receptor es capaz de activar dos factores de transcripción llamados EIN3 y EIL1. Estas proteínas, al unirse a las secuencias de ADN que actúan como sus blancos, inducen la transcripción de toda una serie de genes que en última instancia son los que en conjunto generan “la respuesta a etileno”. Revisiones completas sobre los mecanismos involucrados en la percepción y transducción de señales del etileno pueden encontrarse en: Guzman y Ecker, 1990; Ecker, 1995; Bleecker y Schaller, 1996; Kieber, 1997; Ciardi y Klee, 2001; Chen y col, 2005.

Al igual que la síntesis, la percepción del etileno puede ser inhibida artificialmente. Para ello se utilizan moléculas estructuralmente similares al etileno que van a competir con éste por la unión a su receptor. Entre los inhibidores más utilizados se encuentran el AgNO_3 , del cual se desconoce el mecanismo de acción, y el *trans*-ciclo-octeno que es el inhibidor más potente de la percepción del etileno descubierto hasta el momento (Beyer, 1979; Sisler y col., 1990).

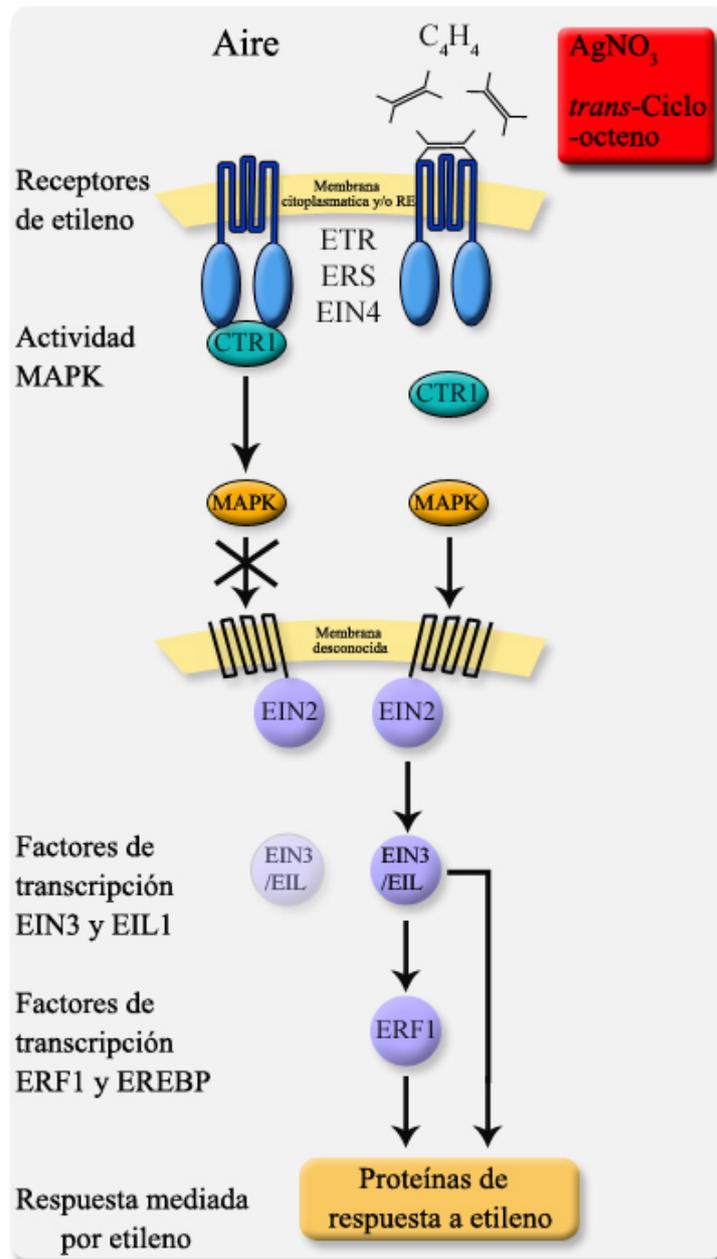


Figura V.4: Representación esquemática de las vías de percepción y transducción de señales de etileno. El cuadro rojo indica los inhibidores conocidos de estas vías y la etapa en la cual actúan.

V.1.3 – Principales funciones del etileno

En general, el etileno participa en procesos en los que la planta cambia su estadio de desarrollo. Además, muchas de las funciones desempeñadas por esta hormona están en íntima relación con la acción de otras fitohormonas. La tabla V.1 enumera algunos ejemplos de las acciones conjuntas llevadas a cabo por el etileno y otras hormonas.

Hormona	Efectos agonistas	Efectos antagonistas
ABA	Inhibición del crecimiento de raíces (Beaudoin y col., 2000; Ghassemian y col., 2000)	El etileno reduce la síntesis de ABA (Fedoroff, 2002). Germinación de semillas (Kucera y col., 2005)
Ácido jasmónico	Respuesta a heridas (Leon y col., 2001; Schmelz y col., 2003)	Inducción de la muerte celular (Tuominen y col., 2004)
Ácido salicílico	Muerte celular mediada por H ₂ O ₂ (van Camp y col., 1998)	Defensa contra el ataque de insectos (Zarate y col 2007)
Giberelinas	Inducción de la germinación (Kucera y col., 2005)	Crecimiento de raíces (Archard y col., 2003)
Auxinas	Desarrollo de raíces (Ruzicka y col., 2007; Stepanova y col., 2007)	Abscisión de hojas (van Doorn y Stead, 1997)

Tabla V.1: Efectos cooperativos y antagonistas descritos entre etileno y otras fitohormonas.

Dentro de las funciones estudiadas más ampliamente del etileno encontramos las siguientes:

- El etileno promueve la maduración de frutos mediante la activación de la ruptura enzimática de las paredes celulares, la hidrólisis del almidón contenido en los frutos y la concomitante acumulación de azúcares. Este efecto se utiliza habitualmente para el manejo de frutos a nivel comercial. El ejemplo más claro de la utilización comercial de esta hormona lo constituyen las plantas de tomate genéticamente modificadas de forma tal que la expresión de la ACC sintetasa ha sido silenciada (Figura V.5). Estas plantas son incapaces de generar etileno suficiente para madurar los frutos, por lo que éstos se cosechan verdes, se transportan y al llegar al sitio de comercialización se los incuba en cámaras con etileno en las que se dispara su maduración (Hamilton y col., 1990; Oeller y col., 1991; Rottmann y col., 1991; Gray y col., 1992; Theologis, 1992).

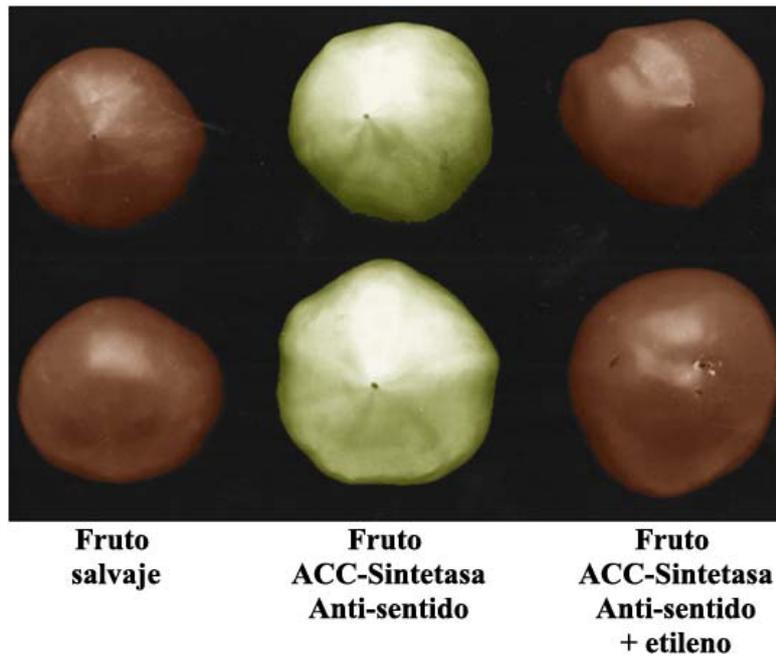


Figura V.5: Frutos de tomates salvajes y transgénicos donde la expresión del gen que codifica para la ACC-sintetasa ha sido silenciada mediante técnicas de ARN anti-sentido. Estos frutos permanecen verdes hasta que se les aplica etileno en forma exógena.

- El etileno participa activamente de los mecanismos de defensa que se activan después que una planta sufre una herida. Su accionar en este caso se basa en generar muerte celular programada en el área de la lesión a fin de frenar una posible infección; activar los genes encargados de curar la herida y los mecanismos generales de defensa de la planta (Leon y col., 2001; Francia y col., 2007; Wasternack, 2007).
- El etileno induce la senescencia de hojas. Existen numerosas evidencias experimentales que demuestran el efecto de esta hormona en el proceso de envejecimiento de la planta. Durante este proceso el etileno produce una pérdida marcada de clorofilas y una reducción de la tasa de fotosíntesis (Gepstein y Thimann, 1981; Grbic y Bleecker, 1995).
- Otros procesos conocidos en los que participa el etileno son: modulación de la epinastia de las hojas, inducción de la expansión lateral de las células, inducción de la abscisión de hojas, ruptura de la dormancia de brotes y semillas, formación y mantenimiento del gancho apical de las plántulas durante la germinación y regulación del desarrollo de las raíces (Avery y Wasserman, 1992; Tanimoto y col., 1995; Fedoroff, 2002; Schaller, 2007).

V.1.4 – El etileno y el estrés hídrico

En las plantas que se someten a estrés hídrico (exceso o escasez de agua) la producción de etileno se encuentra notablemente incrementada. Sin embargo la función de la hormona en estos procesos no ha sido dilucidada claramente. Una de las hipótesis presentadas plantea que la abscisión de las hojas, inducida por etileno, produce una reducción del consumo de agua simplemente causada por la menor superficie de transpiración (Berumen y Lownds, 1996). Otros autores plantearon que el aumento de esta hormona a través de la regulación en la formación de raíces permitiría optimizar la absorción de agua (Sharp, 2002; Sharp y LeNoble, 2002). A su vez la entrada en el estadio de senescencia generada por el aumento de esta hormona induce la movilización de nutrientes desde las hojas hacia las semillas favoreciendo el desarrollo de éstas (Khanna-Chopra y Sinha, 1988). Si bien estos procesos tienden a asegurar la progenie de la especie, favoreciendo y priorizando la generación de semillas, también producen efectos desfavorables para la planta, llevándola casi inexorablemente hacia su muerte. Recientemente, Rivero y colaboradores (2007) demostraron que se puede obtener una tolerancia incrementada a estrés hídrico simplemente retrasando la entrada en senescencia de las plantas estresadas. En este sentido, este retraso producido por la disminución de la concentración de etileno evita este desesperado intento de mantener la progenie, permitiendo que la planta tolere por un tiempo más prolongado la condición de sequía para dar lugar a una mejor productividad en el caso que la sequía sea temporal y reversible.

V.1.5 – HAHB4 y el etileno

Como describimos en el capítulo anterior el análisis del transcriptoma de plantas de *Arabidopsis* que expresan en forma constitutiva el factor de transcripción HAHB4 indicó que este gen podría estar actuando en procesos mediados por etileno. Una observación interesante de ese análisis indica que muchos de los genes involucrados en los procesos mediados por etileno y a su vez regulados por HAHB4 son además regulados cuando una planta salvaje es sometida a condiciones de sequía.

Teniendo en cuenta estos estudios se nos plantearon los siguientes interrogantes: ¿Podría ser explicada la tolerancia a sequía conferida por HAHB4 por los efectos del gen sobre las vías de síntesis y percepción de etileno? ¿Están relacionadas las observaciones realizadas en el ensayo de microarreglos con la función del gen en girasol? ¿Se alteran los procesos fisiológicos modulados por etileno a causa de los

cambios moleculares producidos por este factor de transcripción? ¿La expresión de *HAHB4* es regulada por etileno?

Poder responder estas preguntas fue el objetivo principal de este período del trabajo de Tesis.

V.2 – Resultados.

V.2.1 – *HAHB4* reprime la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y percepción de etileno en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Como se describió en el capítulo 1 de esta Tesis, el análisis del transcriptoma de plantas de *Arabidopsis* que expresan en forma constitutiva el gen *HAHB4* reveló que este factor de transcripción es capaz de reprimir la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y percepción de etileno. En la tabla V.2 se presenta una lista completa de estos genes y sus niveles relativos de expresión obtenidos tanto de los ensayos de microarreglos como en las medidas cuantitativas hechas por RT-PCR en tiempo real.

A. Datos obtenidos en el análisis del microarreglo			
Identificación	Descripción	S/S-D	TG/S
At1g62380	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACC-Oxidasa)	-2,264 p-Val=1.E ⁻⁰⁹	-2,724 p-Val=2.E ⁻⁰⁵
At1g06620	2-oxoglutarato-dependiente dioxigenasa (2-ODD)	-1,462 p-Val **	+1,866 p-Val=2.E ⁻¹⁰
At2g36880	S-adenosilmetionina sintetasa (AdoMet-Sintetasa)	+0,142 p-Val **	-2,029 p-Val=2.E ⁻⁰⁴
At2g27050	Insensible a etileno 1 (EIL1)	-1,309 p-Val **	-1,847 p-Val=1.E ⁻⁰³
At5g47220	Factor de respuesta a etileno 2 (ERF2)	-2,715 p-Val <1.E ⁻¹⁰	-1,956 p-Val=1.E ⁻⁰²
At5g47230	Factor de respuesta a etileno 5 (ERF5)	-6,347 p-Val <1.E ⁻¹⁰	-2,041 p-Val=1.E ⁻⁰⁴
At5g61600	Factor de respuesta a etileno B3 (ERF B3)	-6,984 p-Val <1.E ⁻¹⁰	-3,251 p-Val<1.E ⁻¹⁰
At3g20310	Factor de respuesta a etileno 7 (ERF 7)	-1,803 p-Val=3.E ⁻⁰⁹	-2,748 p-Val=1.E ⁻⁰²

At5g51190	Factor de transcripción con dominio AP2	-3,937 p-Val<1.E ⁻¹⁰	-2,486 p-Val=1.E ⁻⁰⁹
At3g62550	Proteína universal de respuesta a estrés (USP)	-1,774 p-Val=3.E ⁻⁰³	-0,952 p-Val=2.E ⁻⁰³
At3g20770	Insensible a etileno 3 (EIN3)	+0,307 p-Val **	-2,094 p-Val=3.E ⁻⁰⁵

B. Datos obtenidos en RT-PCR cuantitativa

Identificación	Descripción	S	S-D	TG
At1g62380	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACC-oxidasa)	1±0.083	0,50±0.021	0,62±0.019
At2g36880	S-adenosilmetionina sintetasa (AdoMet-Sintetasa)	1±0.114	1,12±0.139	0,32±0.082
At2g27050	Insensible a etileno 1 (EIL1)	1±0.138	0,89±0.099	0,21±0.042
At5g47220	Factor de respuesta a etileno 2 (ERF2)	1±0.123	0,32±0.120	0,41±0.076
At5g47230	Factor de respuesta a etileno 5 (ERF5)	1±0.043	0,26±0.009	0,50±0.008
At5g61600	Factor de respuesta a etileno B3 (ERF B3)	1±0.098	0,45±0.035	0,36±0.012
At3g20310	Factor de respuesta a etileno 7 (ERF 7)	1±0.067	0,24±0.074	1,17±0.126
At5g51190	Factor de transcripción con dominio AP2	1±0.045	0,96±0.106	0,17±0.087
At3g20770	Insensible a etileno 3 (EIN3)	1±0.099	0,38±0.041	0,42±0.067

Tabla V.2: Análisis de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y percepción de etileno. A: Datos obtenidos a partir del ensayo de microarreglos. 1ª columna: código de identificación del gen; 2ª columna: nombre por el cual se conoce al gen; 3ª y 4ª columnas: veces de inducción/represión del gen entre plantas salvajes en condiciones control (S) y estresadas (S-D) y entre plantas transgénicas que expresan *HAHB4* (TG) y plantas salvajes (S) respectivamente. El Valor p- (pVal), calculado según el método de Bonferroni (ver Materiales y Métodos) se indica debajo de cada

valor obtenido en el microarrglo. Los p-Val ** son todos aquellos que no resultaron estadísticamente significativos. **B:** Datos obtenidos en la cuantificación por RT-PCR cuantitativa. Las 1^a y 2^a columnas coinciden con la tabla V.2A; de la 3^a a la 5^a columna se muestran los valores medidos en plantas salvajes (S), salvajes estresadas (S-D) y transgénicas (TG). Todos los valores se expresan en forma relativa a los niveles de transcripción medidos en las plantas utilizadas como control (S) a los cuales se les asignó arbitrariamente el valor 1. Cada celda incluye la desviación estándar calculada a partir de triplicados biológicos. La diferencia en la expresión de un gen entre muestras fue considerada significativa cuando el Valor p- calculado fue menor a 0,01.

Las proteínas codificadas por estos genes actúan en distintos pasos de los procesos de síntesis y percepción de esta hormona. En la figura V.6 se puede apreciar cuáles son las etapas en las que participa cada uno de los genes regulados por HAHB4. Si bien todos estos genes cumplen funciones importantes en las vías metabólicas mediadas por etileno, sólo algunos de ellos son cruciales. Si tomamos en cuenta la reducción en la expresión de *SAM* y *ACC-oxidasa* más la activación de *2-ODD* el resultado sería una clara reducción en la producción de esta hormona. Otro resultado importante que surge del ensayo de microarreglos es la represión de los genes *EIN3* y *EIL1*. Estos genes codifican dos factores de transcripción hacia los cuales converge toda la vía de señalización disparada después de que el etileno se une a su receptor.

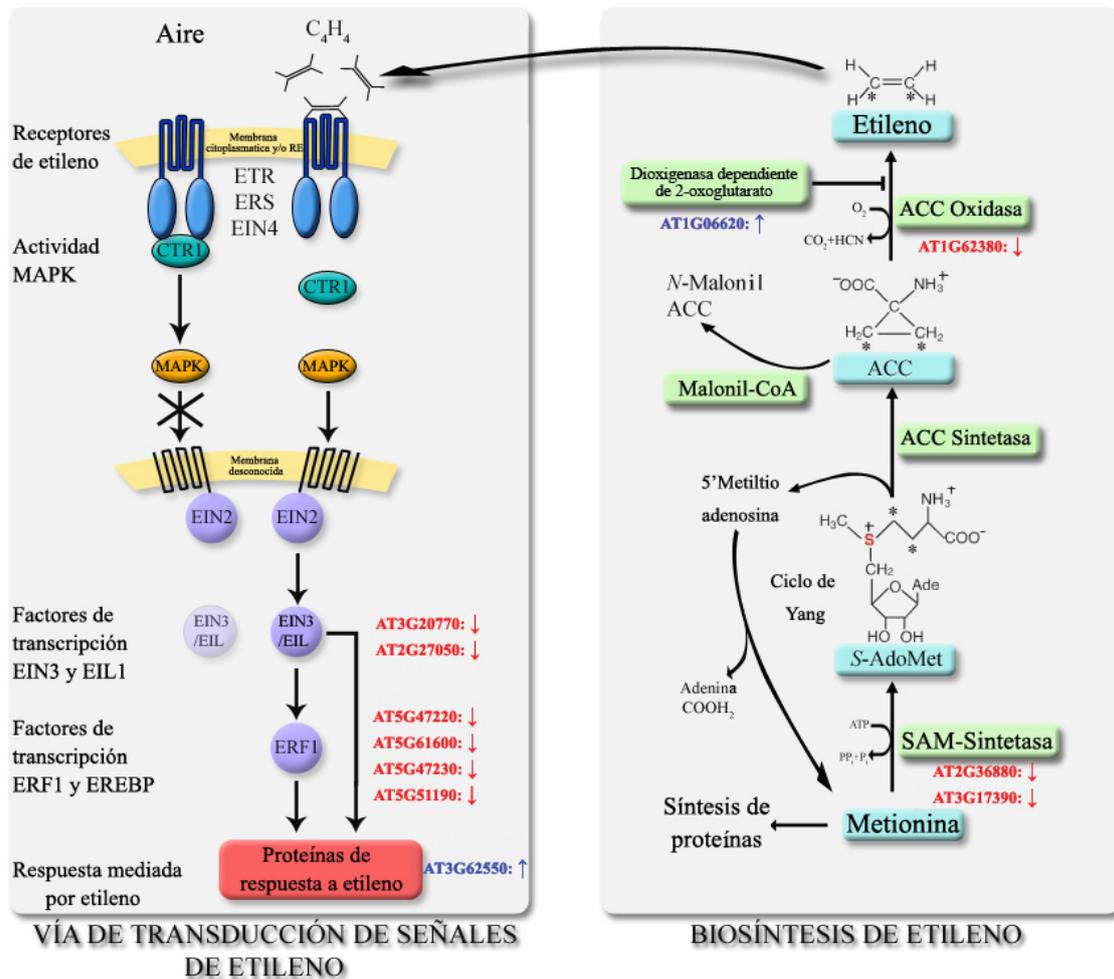


Figura V.6: Representación esquemática de las vías de síntesis y de transducción de señales de etileno. En rojo se indican los códigos de identificación de los genes reprimidos por HAHB4 y en azul los que son inducidos por este factor de transcripción.

A pesar de que las observaciones moleculares indican que HAHB4 reprime la síntesis y percepción del etileno, no es posible asegurar que esto se refleje en cambios fisiológicos en la planta. Podrían presentarse discrepancias entre las observaciones moleculares y fisiológicas debidas a que los niveles de las proteínas existentes, aunque sean bajos, fueran suficientes para ejercer su función. Además, aún estando totalmente reprimido un gen y por ende, la síntesis de la proteína producto del mismo, en las familias multigénicas las funciones podrían suplirse por otros miembros. Por esto resultaba de suma importancia determinar si los cambios transcripcionales provocados por la expresión de *HAHB4* repercutían en los procesos biológicos mediados por etileno.

V.2.2 – Las plantas transgénicas que expresan HAHB4 presentan un marcado retraso en la entrada en senescencia.

La senescencia es el proceso por el cual un ser vivo envejece. Este envejecimiento está determinado por un deterioro en las células que componen al individuo. En las plantas la senescencia se caracteriza por un aumento en la muerte celular programada, la pérdida de pigmentos, la movilización de nutrientes hacia las semillas y la abscisión de las hojas. El etileno dispara y regula todos estos eventos que conforman y caracterizan al envejecimiento vegetal.

Uno de los primeros indicios sobre la participación de HAHB4 en los procesos fisiológicos mediados por etileno fue obtenido durante la observación del desarrollo y en particular del ingreso al estadio de senescencia de las plantas transgénicas que expresaban este factor de transcripción como transgén. Tanto en aquellas que lo expresan en forma constitutiva como en las que lo hacen en forma inducible se nota un marcado retraso en la entrada en senescencia cuando se las compara con sus contrapartes salvajes (Figura V.7).



Figura V.7: Diferencia en la entrada en senescencia de plantas salvajes (S) y plantas transgénicas *35S:HAHB4* (35S) o *PEL:HAHB4* (PEL). Las imágenes fueron tomadas de plantas de 45 días en las que se puede observar la diferencia máxima entre los distintos genotipos.

La formación de vainas y maduración de semillas son procesos que comienzan cuando las hojas están aún verdes y fotosintéticamente activas. En las plantas salvajes la senescencia se inicia mientras las semillas aún se están desarrollando mientras que en ambos genotipos transgénicos este proceso ocurre estando las plantas completamente

verdes. Con el objeto de determinar el tiempo que transcurre entre la germinación y el ingreso a la senescencia se sembraron en una misma bandeja 16 plantas de cada genotipo (salvajes, *35S:HAHB4* y *PEL:HAHB4* (promotor de *HAHB4*)). Estas plantas se cultivaron en condiciones óptimas de iluminación y riego observando constantemente el estado de las hojas. Se estableció como día de inicio de la senescencia cuando las hojas de una planta mostraban signos claros de clorosis. Los resultados obtenidos de este estudio muestran que las plantas que expresan *HAHB4* en forma constitutiva entran en senescencia alrededor de un mes más tarde que las plantas salvajes, sobre todo aquellas de muy alta expresión. Las plantas que expresan el gen en forma inducible presentan tiempos de entrada en senescencia intermedios entre los otros dos genotipos.

Uno de los mecanismos posibles que explicaría el retraso en el ingreso en la senescencia de las plantas transgénicas podría ser la represión de la expresión de los genes involucrados en la síntesis y percepción de etileno aunque el efecto observado podría deberse también a otro proceso no ligado necesariamente a esta hormona. Con el objetivo de verificar o refutar esta hipótesis decidimos ensayar el efecto del agregado de etileno exógeno sobre la entrada en senescencia de las plantas con distintos genotipos. En este ensayo cualquier indicio de senescencia sería producto del agregado de etileno ya que estas plantas jóvenes crecidas en condiciones óptimas estarían lejos de entrar en forma natural en esta etapa. Se tomaron plantas de 20 días de edad y se rociaron con 100 μM o 300 μM de Ethephon. Como ya se explicó, este compuesto libera etileno en forma progresiva una vez absorbido por la célula. Como se muestra la figura V.8 ambas concentraciones del agente químico fueron suficientes para inducir el ingreso en senescencia de las hojas de plantas salvajes mientras que el efecto en los genotipos transgénicos fue prácticamente indetectable.

Estos resultados indican claramente que *HAHB4* sería un regulador del ingreso a la etapa de senescencia mediado por etileno.